



Z A Ś W I A D C Z E N I E

Janusz Marcinkiewicz
Kraków , Polska

Andrzej Kasprowicz
Kraków , Polska

Ewa Remin
Kraków , Polska

Andrzej Remin
Kraków , Polska

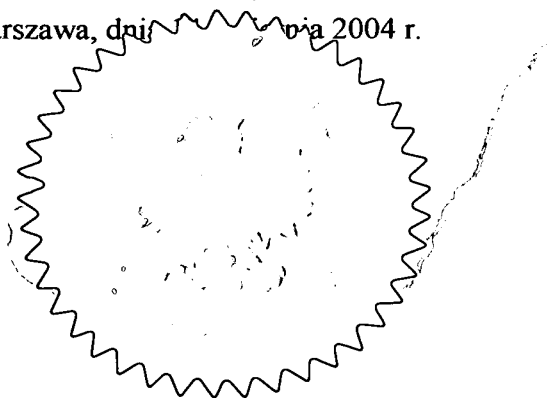
Małgorzata Galos-Hudy
Czernichów , Polska

złożyli w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej dnia 07 kwietnia 2004 r. podanie o udzielenie patentu na wynalazek pt.: „**Sposób hamowania rozwoju bakterii i grzybów chorobotwórczych i kompozycja bakteriobójcza**”.

Dołączone do niniejszego zaświadczenia opis wynalazku, zastrzeżenia patentowe i rysunki są wierną kopią dokumentów złożonych przy podaniu w dniu 07 kwietnia 2004 r.

Podanie złożono za numerem P-367052.

Warszawa, dnia 12 kwietnia 2004 r.



z upoważnienia Prezesa


inż. Barbara Zabczyk

Naczelnik

Sposób hamowania rozwoju bakterii i grzybów chorobotwórczych i kompozycja bakteriobójcza

5 Przedmiotem wynalazku jest sposób hamowania rozwoju drobnoustrojów chorobotwórczych i kompozycja przeciwdrobnoustrojowa, stosowana w leczeniu chorób skóry, wywołanych między innymi bakteriami z rodzaju *Propionibacterium*, zwłaszcza w leczeniu trądziku pospolitego (*acne vulgaris*).

Zgłoszenie niniejsze jest zgłoszeniem dodatkowym do zgłoszenia wynalazku pod tytułem „Sposób hamowania rozwoju bakterii i grzybów chorobotwórczych i kompozycja bakteriobójcza”, dokonanego w dniu 22 kwietnia 2003 roku w Urzędzie Patentowym RP i oznaczonego numerem P 359792. Przedstawiony w nim sposób hamowania rozwoju bakterii i grzybów chorobotwórczych polega na oddziaływaniu na bakterie i grzyby skuteczną ilością bromaminy tauryny. Z kolei, podstawowym składnikiem kompozycji bakteriobójczej, według tego wynalazku, była bromamina tauryny stanowiąca od 10% do 100% wagowych kompozycji.

Trądzik pospolity (*acne vulgaris*) należy do jednej z najczęściej spotykanych chorób skóry wieku młodzieńczego. Schorzenie to dotyczy zmian przywłosowych mieszków łojowych lub mieszków i związanych z nimi gruczołów łojowych, wraz z wyścielonym keratynocytami przewodem wydzielniczym. Pomimo postępów w diagnostyce oraz w leczeniu, trądzik nadal stanowi otwarty problem nie tylko dla pacjenta, lecz również dla lekarzy-badaczy, zajmujących się tym zagadnieniem. Przyjmuje się, że u 85% populacji ludzkiej w wieku dojrzewania występują mniej lub bardziej nasilone zmiany. Zaostrzone zmiany trądzikowe występują głównie między 14 a 19 rokiem życia i dotyczą 10% populacji. Obie płcie są w równym stopniu predysponowane do wystąpienia

trądziku, cięższe postacie występują jednak częściej u mężczyzn. Wynika to z uwarunkowań genetycznych i hormonalnych.

Etiologia zmian trądzikowych ma różne podłoże, wymienia się między innymi czynniki hormonalne, genetyczne, immunologiczne i bakteryjne. Trądzik młodzieńczy powstaje w wyniku zwiększonej produkcji łoju w gruczołach skórnych, co ma związek ze wzmożoną produkcją hormonów androgennych, występującą w okresie pokwitania. W rozwoju choroby główną rolę odgrywają cztery czynniki: zwiększona produkcja łoju, nadmierne rogowacenie i zacopowanie ujść aparatu mieszkowo-łojowego, kolonizacja gruczołów łojowych przez bakterie beztlenowe (o pełnej łacińskiej nazwie *Propionibacterium acnes*), oraz rozwój stanu zapalnego wokół gruczołów łojowych, czego wynikiem jest tworzenie się zaskórników, grudek zapalnych, powierzchownych cyst, torbieli i krost. Wspomniane androgeny stymulują sekrecję łoju przez gruczoły łojowe. Łój jest substancją tłuszczową, która utrzymuje właściwą wilgotność skóry oraz keratyny, będącej głównym składnikiem włosa. Drugą istotną przyczyną powstawania trądziku jest niedrożność przewodów odprowadzających łój na powierzchnię skóry. Utrudnione wydalanie łoju prowadzi do poszerzenia przewodów gruczołów łojowych i powstawania początkowo zaskórniaków zamkniętych, a następnie otwartych. Zatkane ujście powoduje, że nadmierna ilość powstającego łoju nie ma się gdzie ewakuować. Na twarzy powstają zmiany z czarnymi punktami lub z białymi "czubami". Są to zmiany o charakterze niezapalnym. Jeśli ściana przepelnionego mieszka pęka, łojowa wydzielina przedostaje się do okolicznych tkanek, co prowadzi do powstania trądziku zapalnego. Infekcja przechodzi w głąb skóry, powstają cysty, które później pękają i pozostawiają przejściowe lub trwałe blizny. Zmiany takie mogą ulec nadkażeniu. Bakterie *P. acnes*, produkując czynniki chemotaktyczne, powodują napływ leukocytów wielojądrzastych do gruczołów łojowych. W następstwie fagocytozy bakterii, spowodowanej przez te leukocyty, uwolnione zostają enzymy hydrolityczne, które prowadzą do zniszczenia ścian gruczołów łojowych, wydostania się ich zawartości do skóry właściwej i rozwoju stanu zapalnego. Pojawiają się wykwity grudkowo - krostkowe. W cięższych postaciach trądziku tworzą się głębokie nacieki ropne i przetoki, które pozostawiają po sobie

60 szpecące blizny. W obrębie zaczopowanych gruczołów łojowych dochodzi do rozwoju bakterii beztlenowych, które wytwarzając enzymy rozkładające łój skórny do wolnych kwasów tłuszczowych, nasilają stan zapalny. *P. acnes* i *P. granulosum* występują głównie w regionach ciała ludzkiego bogatych w gruczoły łojowe, takich jak głowa, klatka piersiowa, plecy - głównie okolice
65 międzyłopatkowe.

Czynniki wymienione wyżej, w tym występowanie na skórze zwiększonych ilości drobnoustrojów, powodują przewlekły proces zapalny, obejmujący w bardzo zróżnicowanym stopniu przywłosowe mieszki łojowe i związane z nimi gruczoły łojowe. Pobudzone gruczoły łojowe prowadzą do
70 nadmiernej produkcji łoju, zaś bogata w lipidy wydzielina staje się doskonałą pożywką do namnażania się bakterii. Zaobserwowano powiązanie pomiędzy nasileniem trądziku a intensywnością wydzielania łoju. Równolegle w obrębie gruczołu łojowego dochodzi do dyskeratynizacji, czyli nadmiernego, nieprawidłowego rozrostu keratynocytów przewodowych i odrywania się
75 komórek gruczołu łojowego, co powoduje zaczopowanie ujścia gruczołu, a także stwarza dogodne warunki dla rozwoju bakterii beztlenowych.

Mając na uwadze tak zróżnicowaną etiologię zmian trądzikowych, nasilenie tych zmian i różnej lokalizacji wykwitów, powstało wiele, często odmiennych, koncepcji w leczeniu tego schorzenia. Głównym celem leczenia
80 trądziku pospolitego jest powstrzymanie objawów łojotoku, zwężenie porów skóry, usunięcie zalegającej wydzieliny, zapobieganie tworzeniu się zaskórników, zmniejszenie wydzielania łoju, złagodzenie stanów zapalnych, zmniejszenie nadwrażliwości skóry. W tym celu stosowane są różne terapie, takie jak terapia hormonalna (estrogeny, progesteron), terapia witaminowa
85 (witaminy B2, A, C, E, PP) czy terapia antybiotykowa (tetracyklina, erytromycyna).

Tradycyjne leczenie polega na miejscowym stosowaniu mieszanek wysuszających z dodatkiem kwasu salicylowego, mentolu, siarki, rezorcyny, naświetlaniu słońcem lub lampą kwarcową, ale obecnie nie jest praktykowane.
90 Kwas salicylowy nie jest już praktycznie w ogóle zalecany w terapii trądziku, ponieważ powoduje podrażnienia u wielu chorych. Dodatkowo, jako środek wspomagający leczenie, zalecane są duże ilości witamin, szczególnie z grupy

witamin B. Do jednej z grup należą leki hormonalne obniżające aktywność androgenów. Najczęściej stosowanymi są leki zawierające progestageny. Ich
15 szczególnie skuteczne działanie występuje w przypadku umiarkowanego trądziku. Działają one na zasadzie, iż zmniejszając stężenie androgenów, jednocześnie obniżają wydzielanie łoju i zmniejszają komponentę zapalną. Lekiem, który również obniża aktywność androgenów i jest popularny w leczeniu trądziku, jest spironolakton. Zostało dowiedzione, że również
10 kortykosterydy, podawane ogólnie, hamują wydzielanie androgenów. Kortykosterydy są w szczególności używane w formie wstrzyknięć bezpośrednio do izolowanych, szpecących zmian trądzikowych o charakterze torbieli czy guzków, w celu przyspieszenia ich gojenia. Leki hormonalne nie są jednak najwłaściwsze i nie sprawdzają się w przypadku zaawansowanego
15 schorzenia skóry. Ponadto w przypadku stosowania większych dawek wspomnianego spironolaktonu, można zaobserwować skutki uboczne, w postaci zaburzeń miesiączkowania u kobiet oraz ginekomastię i utratę libido u mężczyzn. Dodatkowo mogą wystąpić zawroty głowy i ogólne uczucie zmęczenia.

110 Kolejną grupą leków są retinoidy, które są pochodnymi witaminy A. Ich głównym zadaniem jest zmniejszenie procesu keratynizacji. Preparaty te są stosowane zarówno miejscowo, jak i ogólnie. Podawana miejscowo tretynoina charakteryzuje się tym, iż normalizuje nieprawidłowe w trądziku rogowacenie mieszkowe, zwalnia proces złuszczenia się komórek nabłonkowych oraz
115 osłabia połączenia między nimi. Wśród retinoidów, stosowanych ogólnie, najskuteczniejsza okazała się izotretynoina, której działanie oparte jest na zmniejszaniu wydzielania łoju, równocześnie normalizuje ona proces keratynizacji w obrębie mieszków włosowych i chociaż nie ma bezpośredniego działania przeciwbakteryjnego, wymienione wyżej efekty działania prowadzą do
120 zmniejszenia liczby zmian trądzikowych, w obrębie mieszków włosowych. Do leczenia przewlekłych, zmienionych zapalnie cyst preferuje się doustne stosowanie izotretynoiny. Lek ten, jak już wcześniej zostało stwierdzone, charakteryzuje się bardzo wysoką skutecznością w leczeniu trądziku o ciężkim przebiegu, z obecnością zapalnie zmienionych cyst, jednak terapia taka
125 powinna być bardzo uważnie monitorowana, gdyż lek ten nie jest całkowicie

bezpieczny, szczególnie dla kobiet, które przed rozpoczęciem stosowania leku powinny wykonać test ciążowy, ponieważ leku tego nie wolno stosować w ciąży (potencjalne uszkodzenie płodu). Ponadto w czasie stosowania preparatu izotretynoiny kobiety powinny zażywać doustne środki antykoncepcyjne.

130 Działanie retinoidów polega na normalizacji procesów złuszczenia w obrębie przewodów wyprowadzających gruczołów łojowych, umożliwieniu ewakuacji wydzieliny gruczołów i w efekcie na znacznym ograniczeniu komedogenezy. Stąd głównym wskazaniem do ich stosowania jest *acne comedonica*. Objawy niepożądane pod postacią wysuszenia, złuszczenia, zaczerwienienia skóry są

135 najczęstsze w przypadku stosowania tretynoiny. Są to tak zwane działania teratogenne. Ponadto, jak już wcześniej wspomniano, leki z grupy retinoidów nie mają bezpośredniego działania bakteriobójczego, tak wymaganego w przypadku leczenia zmian skórnych. A poza tym terapia retinoidami pociąga za sobą ryzyko wielu działań niepożądanych. Oprócz działań teratogennych, na

140 uwagę zasługuje wzrost transaminaz i bilirubiny oraz hipertrójglicerydemia. Dlatego też zaleca się, szczególnie u osób z grupy ryzyka: z rodzinną hipertrójglicerydemią i cukrzycą, wykonanie przed i po leczeniu, ewentualnie po 2 miesiącach, badań kontrolnych: podstawowych, wątrobowych oraz lipidowych. Częstym skutkiem ubocznym jest wysychanie śluzówek: warg, jamy

145 nosowej, spojówek.

Do kolejnej grupy leków stosowanych w tym schorzeniu skóry należą antybiotyki, stosowane zarówno miejscowo, w postaci płynów do przemywania, żelu, maści, jak i podawane doustnie. Głównym zadaniem tej grupy leków jest działanie przeciwbakteryjne, obniżające poziom bakterii kolonizujących ujścia

150 gruczołów łojowych. Antybiotyki, obniżając liczbę drobnoustrojów, pośrednio obniżają także stężenie wolnych kwasów tłuszczowych, czego następstwem jest obniżenie poziomu lipazy i proteazy w mieszkach włosowych. Dlatego działanie antybiotyku jest równocześnie działaniem przeciwbakteryjnym i przeciwzapalnym. Główne grupy antybiotyków stosowane w leczeniu trądzika to

155 tetracykliny, makrolidy, klindamycyna oraz kotrimoksazol. Wadą jednak zastosowania wyżej wymienionych antybiotyków ~~jest~~ jest niemożność stosowania ich jako terapii przez dłuższy czas, mianowicie mogą one być stosowane od 3 – 4 tygodni. Ponadto nadmierne, niekontrolowane i nieprzemyślane podawanie

antybiotyków i sulfonamidów, jakie miało miejsce w latach siedemdziesiątych i
 160 osiemdziesiątych - sprawiło, że obecnie kilkudniowe stosowanie wielu
 chemioterapeutyków, nawet na skórę, jest przyczyną indukowania na nie
 oporności bakterii i tym samym braku ich skuteczności. Dotyczy to, m.in.
 neomycyny i tetracyklin. Ponadto istnieje możliwość wystąpienia reakcji
 alergicznych.

165 Oprócz antybiotyków w leczeniu łagodnych zmian trądzikowych stosowany
 jest szereg miejscowych środków o działaniu przeciwbakteryjnym, jak
 przykładowo nadtlenek benzoilu, kwas azelanowy, preparaty siarki czy,
 wspomniany już wcześniej, kwas salicylowy.

Mniej znaną terapią jest wstrzykiwanie bezpośrednio w cystę
 170 triamcynolonu, rodzaju steroidu. Efektem ubocznym tego rodzaju działania
 może być czasowe ściemnienie skóry wokół miejsca iniekcji.

Ponadto stosowane są także terapie wspomagające, które powinny
 rozpocząć się od prawidłowej, szeroko pojętej edukacji pacjenta.
 Indywidualizacja schematów leczenia, stosowanie jednego, dwóch lub kilku
 175 leków równocześnie, połączone z prawidłowo wykonywanymi zabiegami
 higieniczno – kosmetycznymi, ewentualnie krioterapia, laseroterapia czy
 leczenie ciekłym azotem może efektywnie złagodzić zmiany trądzikowe.

Znana jest również, testowana klinicznie, metoda terapii fotodynamicznej.
 Do obiecujących efektów procesu fotodynamicznego, obserwowanego po
 180 zewnętrznym zastosowaniu roztworu ALA oraz naświetlaniu skóry u pacjentów
 z trądzikiem, należą przede wszystkim zmniejszenie ilości zmian zapalnych,
 fotocytotoksyczne uszkodzenia gruczołów łojowych, długotrwała supresja
 produkcji łoju oraz znaczne obniżenie ilości bakterii.

W niektórych przypadkach stosuje się szczepionki lub autoszczepionki.
 185 Niezależnie od faktu, czy w terapii stosowana jest szczepionka czy
 autoszczepionka, reakcje immunologiczne zachodzą według identycznego
 schematu, bowiem wszystkie te preparaty zawierają szczepy *P. acnes* o silnym
 działaniu immunomodulującym. Praktyka jednak wskazuje, iż w przypadku
 pacjentów leczonych za pomocą szczepionek lub autoszczepionek, istnieje
 190 potrzeba równoczesnego podawania, wraz ze szczepionką, preparatów o

działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwzapalnym. Stwierdzono jednak, że leczenie szczepionkami, zawierającymi antygeny *Propionibacterium acnes* i *Propionibacterium granulosum*, okazało się mało skuteczne - jedynie u około 30% chorych uzyskano ograniczoną poprawę. U części chorych może nawet
 195 dochodzić do pogorszenia stanu klinicznego. Podawanie autoszczepionek, w świetle współczesnej wiedzy, nie ma więc żadnego uzasadnienia. Podobnie, zarzucono jako szkodliwe, metody leczenia bodźcowego, jak autohemo- i autoseroterapia.

Ideą wynalazku jest to, że w kompozycji bakteriobójczej, podstawowym składnikiem jest roztwór bromaminy tauryny w żelu etylocelulozowym o pH 5 do
 200 pH 7.4.

Korzystnie podstawowy składnik jest roztworem bromaminy tauryny w kremie cetomakrogolowym o pH 5 do pH 7.4.

Korzystnie podstawowy składnik jest roztworem bromaminy tauryny i wraz
 205 z pudrem tworzy zawiesinę.

Korzystnie kompozycja bakteriobójcza składa się z 14.0 do 50.0 % wagowych bromaminy tauryny, 10.0 do 24.0 % wagowych talku, 14.0 do 40.0 % wagowych glicerolu, 1.0 do 4.0 % wagowych wody destylowanej i 0.5 do 2.0% wagowych mentolu.

Ideą wynalazku jest również to, że bromaminę tauryny użyto jako lek w
 210 leczeniu chorób skóry, zwłaszcza w leczeniu trądziku

Ideą wynalazku jest także to, że w sposobie otrzymywania bromaminy tauryny do użycia w kompozycji bakteriobójczej, roztwór NaOBr wkrapla się bardzo wolno mieszając do roztworu tauryny o stężeniu około 8 -12 razy
 215 wyższym od stężenia roztworu NaOBr, korzystnie 10 razy wyższym od stężenia roztworu NaOBr.

Ideą wynalazku jest również to, że w kompozycji kosmetycznej, w kosmetycznie dopuszczalnym podłożu użyto bromaminę tauryny stanowiącą od 10% do 100% wagowych kompozycji.

Podczas badań nieoczekiwanie stwierdzono, że bromamina tauryny, która
 220 jak się okazało ma dużo silniejsze działanie bakteriobójcze niż chloramina tauryny, działa bakteriobójczo na bakterie z rodzaju *Propionibacterium*, które są jednym z czynników etiologicznych trądziku pospolitego (*acne vulgaris*).

Ponadto jak się okazało bromamina tauryny nie niszczy całej flory bakteryjnej
 225 lecz działa wybiórczo w określonych warunkach.

Ze stanu techniki są znane różne metody otrzymywania bromaminy tauryny. Bromaminę tauryny, dla potrzeb wykazania własności bakteriobójczych bromaminy tauryny według wynalazku, przygotowywano w dniu eksperymentu. W tym celu mieszano roztwór 180 mM NaOCl (Aldrich, Niemcy) w buforze fosforanowym (POCH, Gliwice, Polska) tak aby uzyskać roztwór NaCl o stężeniu 60 mM. 60 mM roztwór NaCl mieszano w równych proporcjach z roztworem 100 mM NaBr (POCH, Gliwice, Polska). Uzyskany w ten sposób NaOBr rozcieńczano w buforze fosforanowym (POCH, Gliwice, Polska) uzyskując końcowe stężenie NaOBr nie przekraczające 10 mM. W celu
 230 otrzymania bromaminy tauryny roztwór NaOBr wkraplano (bardzo wolno mieszając) do roztworu tauryny (*Sigma*, St. Louis, MO) o stężeniu około 100 mM, tym samym stężenie roztworu tauryny było 8 -12 razy wyższe od stężenia roztworu NaOBr, mimo że można stosować taurynę w nadmiarze nawet do 100 razy wyższego. Korzystnie przy wytwarzaniu bromaminy tauryny, stężenie
 235 roztworu tauryny było około 10 razy wyższe od stężenia roztworu NaOBr. W końcowym efekcie otrzymywano roztwór bromaminy tauryny o stężeniu nie przekraczającym 10 mM. Molowość otrzymanej bromaminy tauryny określano dokonując pomiaru ekstynkcji przy długości fali $\lambda_{\max} = 286 \text{ nm}$, przy której
 240 molowość bromaminy tauryny jest równa wartości ekstynkcji w pikie / 430^{-1} .

W celu przeprowadzenia badań aktywności przeciwbakteryjnej substancji, zawierającej bromaminę tauryny i przygotowanej sposobem wyżej opisanym, wybrano metodę odciskową z zastosowaniem płytek Rodac o powierzchni 25 cm^2 . Do badań zastosowano podłoże Scheadler Agar Base firmy Dico nr katalogowy 212189 z dodatkiem 5% krwi baraniej. Podłoże to
 245 rozlewano miarowo w warunkach aseptycznych na płytki typu Rodac, do momentu aż otrzymano menisk wypukły. Podłoże przed użyciem przechowywano w szczelnych opakowaniach w lodówce w temperaturze około $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i zużywano w czasie nie dłuższym niż 7 dni od daty przygotowania. Do
 250 badań zakwalifikowano kilku ochotników, którymi były kobiety w wieku od 23 do
 255 27 lat, u których nie zaobserwowano klinicznych zmian chorobowych na

powierzchni skóry i które w czasie trwania badań nie stosowały preparatów o działaniu przeciwbakteryjnym, zarówno na powierzchni skóry jak i wewnętrznie. Badanie aktywności przeciwbakteryjnej bromaminy tauryny przeprowadzono wykonując każdorazowo 5 odcisków z powierzchni skóry pleców każdej z
260 badanych osób. Powierzchnia skóry, na której przeprowadzono badania, była z góry określona i oznaczona numerami od 1 do 5. Po oznakowaniu miejsca prowadzenia badań, na skórę nakładano jałowe gaziki o powierzchni 4 cm^2 wysycone różnymi substancjami. W miejscu oznaczonym „1” na skórę nałożono gazik wysycony 0.9% inj. roztworem NaCl (Polfa Lublin), który był substancją
265 kontrolną nie wykazującą działania przeciwbakteryjnego. W miejscu oznaczonym „2” na skórę nałożono gazik wysycony 4 - 7 mM roztworem bromaminy tauryny w buforze o pH 5 do pH 6.4. W miejscu oznaczonym „3” na skórę nałożono gazik wysycony 4 - 7 mM roztworem bromaminy tauryny w buforze o pH 6.4 do pH 7.4. W miejscu oznaczonym „4” na skórę nałożono
270 gazik wysycony 1% roztworem kwasu salicylowego w buforze o pH 5 i w miejscu oznaczonym „5” na skórę nałożono gazik wysycony 1% roztworem kwasu salicylowego w buforze o pH 7. 1% roztwór kwasu salicylowego w buforze o pH 5 i pH 7 są substancjami rutynowo stosowanymi w leczeniu zmian trądzikowych. We wszystkich miejscach gaziki mocowano na powierzchni skóry
275 pleców na trzydzieści minut, po czym gaziki zdejmowano. Po pięciu minutach od zdjęcia gazika, gdy już skóra wyschła, dociskano płytki typu Rodac tak, aby miejsce poddane działaniu substancji badanej było odcisnięte centralnie na płytce. Następnie płytki umieszczano w warunkach beztlenowych z wykorzystaniem systemu Gas Pack Firmy bioMerieux i inkubowano 5 dni w
280 temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po zakończeniu inkubacji porównywano wyniki wzrostu bakterii na płytkach odciskowych każdej osoby badanej po zadziałaniu substancji badanych z miejsc „2”, „3”, „4”, „5” w porównaniu z płytką kontrolną z miejsca „1”. W przypadkach gdy było to możliwe dokonywano zliczenia wszystkich wyrosłych kolonii bakterii względnie tlenowych i bakterii
285 beztlenowych podając ich liczbę na 1 cm^2 skóry. Badania przeprowadzono czterokrotnie u tych samych osób w odstępach tygodniowych, otrzymując podobne wyniki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono wyraźny spadek ilości bakterii u wszystkich badanych osób na powierzchni skóry

290 poddanej działaniu 4 - 7 mM roztworu bromaminy tauryny w buforze o pH 5 do pH 7.4, z tym, że największy spadek liczby bakterii z wartości niepoliczalnej wynoszącej około 10^4 CFU/cm² do wartości $10^1 - 10^2$ CFU/cm² odnotowano na powierzchni skóry poddanej działaniu 5 mM roztworu bromaminy tauryny w buforze o pH 7.

295 Dalsze badania aktywności przeciwbakteryjnej bromaminy tauryny przeprowadzono z użyciem żelu, kremu i pudru. W tych badaniach użyto układy o konsystencji półstałej i właściwościach plastycznych, zwane dalej preparatami, a w szczególności roztwór bromaminy tauryny w żelu etylocelulozowym o pH 5 do pH 7.4, kremie cetomakrogolowym o pH 5 do pH 7.4 oraz zawiesinę pudru w roztworze bromaminy tauryny.

300 Zawiesinę pudru w roztworze bromaminy tauryny przygotowano na bazie pudru płynnego zmieniając wagowe proporcje składników. Zawiesina składała się z 14.0 do 60.0 % wagowych 10 mM roztworu bromaminy tauryny, 10.0 do 24.0 % wagowych talku, 14.0 do 40.0 % wagowych glicerolu, 5.0 do 30.0 % wagowych wody destylowanej i 0.5 do 2.0% wagowych mentolu. Składniki 305 zawiesiny zostały dokładnie wymieszane do uzyskania jednolitego rozproszenia fazy stałej.

Roztwór bromaminy tauryny w żelu etylocelulozowym sporządzono na bazie roztworu metylocelulozy (Methocel 1500 cP) na jałowym buforze fosforanowym o pH 7.4 wsypując metylocelulozę do około jednej trzeciej 310 przygotowanego roztworu buforowego o temperaturze około 90 °C i wymieszano tak, aby cały proszek był zwilżony. Tak przygotowaną substancję schłodzono. Pozostałą ilość roztworu buforowego, łącznie z roztworem bromaminy tauryny dodano w formie oziębionej i dokładnie wymieszano i pozostawiono w lodówce do wyklarowania.

315 Natomiast do sporządzenia roztworu bromaminy tauryny w kremie, w skrócie preparatu na bazie kremu, wykorzystano krem cetomakrogolowy (Cetomacrogol Carem, Sorbolone Carem) według The Extra Phahmacopoeia, Wyd. 29, który zmodyfikowano wprowadzając bufor fosforanowy o pH 7.4 (o składzie KH_2PO_4 i $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) w różnych ilościach w miejsce wody 320 oczyszczonej. Z kolei chlorokrezol w tym kremie zastąpiono mieszaniną

środków konserwujących w różnych ilościach, która zawierała 1.0 do 3.0 g alkoholu benzylowego, 120 do 200 mg hydroksybenzoesanu metylu i 60 do 100 mg hydroksybenzoesanu propylu. Sporządzenie preparatu na bazie kremu rozpoczęto od stopienia składników fazy olejowej kremu cetomakrogolowego (wosk emulgujący, parafina płynna, wazelina biała) w łaźni wodnej. Następnie fazę wodną (jałowy roztwór fosforanowy, roztwór bromaminy tauryny, środki konserwujące wemulgowano na ciepło w temperaturze około 60 °C do fazy olejowej i mieszano do zastygnięcia.

Gotowe preparaty na bazie kremu i żelu oraz zawiesinę pudru nałożono na powierzchnię skóry osób badanych w miejscach oznaczonych cyframi od 1 do 5. Każdy z preparatów nałożono na powierzchnię około 4 cm² każdej osoby badanej w ten sposób, że w miejscu oznaczonym „1” nałożono 0.4 do 0.8 mM roztworu bromaminy tauryny w żelu etylocelulozowym o pH 5 do pH 7.4, w miejscu oznaczonym „2” nałożono zawiesinę 3.0 do 4.5 mM roztworu bromaminy tauryny w żelu etylocelulozowym o pH 5 do pH 7.4, w miejscu oznaczonym „3” nałożono preparat 0.4 do 0.7 mM roztworu bromaminy tauryny w kremie cetomakrogolowym o pH 7, w miejscu oznaczonym „4” nałożono preparat 3.0 do 4.5 mM roztworu bromaminy tauryny w kremie cetomakrogolowym o pH 5 do pH 7.4 i w miejscu oznaczonym „5” nałożono zawiesinę pudru. Preparaty pozostawiono na powierzchni skóry na 30 minut, po czym dociskano płytki tak, aby miejsce poddane działaniu substancji badanej było odcisnięte centralnie na płytce. Następnie, podobnie jak w przypadku roztworów bromaminy tauryny, płytki umieszczano w warunkach beztlenowych z wykorzystaniem systemu Gas Pack Firmy bioMerieux i inkubowano 5 dni w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu inkubacji porównywano wyniki wzrostu bakterii na płytkach odciskowych każdej osoby badanej po zadziałaniu substancji badanych z miejsc „1”, „2”, „3”, „4” i „5”. W przypadkach gdy było to możliwe dokonywano zliczenia wszystkich wyrosłych kolonii bakterii względnie tlenowych i bakterii beztlenowych podając ich liczbę na 1 cm² skóry. Badania przeprowadzono czterokrotnie u tych samych osób w odstępach tygodniowych, otrzymując podobne wyniki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono najbardziej wyraźny spadek ilości bakterii u wszystkich badanych osób na

powierzchni skóry poddanej działaniu zawiesiny 3.5 mM roztworu bromaminy tauryny w kremie cetomakrogolowym o pH 7.

- 355 Przykładowe roztwory bromaminy tauryny w kremie i żelu oraz przykładowe zawiesiny pudru w roztworze bromaminy tauryny przedstawiono poniżej. Proporcje składników wymienionych poniżej substancji mogą być zmieniane w zależności od wrażliwości skóry. Jednak dla skóry normalnej nie jest wskazane, aby molowość tych substancji przekraczała 5 mM bromaminy tauryny, powyżej której niszczona jest cała flora bakteryjna.

Przykład 1. 100 ml kremu 3.5 mM po modyfikacji

	Emulsja cetomakrogolowa	15.0
365	Parafina płynna	10.0
	Wazelina	10.0
	Alkohol benzylowy	1.5
	Hydroksybenzoesan sodu	0.15
	Hydroksybenzoesan propylu	0.08
370	Glikol propylenowy	5.0
	10 mM bromamina tauryny	35.0
	Woda	ad 100.0

375 Przykład 2. 100 ml kremu 5 mM po modyfikacji

	Emulsja cetomakrogolowa	15.0
	Parafina płynna	10.0
	Wazelina	10.0
380	Alkohol benzylowy	1.5
	Hydroksybenzoesan sodu	0.15
	Hydroksybenzoesan propylu	0.08
	Glukoza propylu	5.0
	10 mM bromamina tauryny	50.0
385	Woda	ad 100.0

Przykład 3. 100 ml żelu 3.5 mM po modyfikacji

390	5% roztwór metylocelulozy	65.0
	10 mM bromamina tauryny	35.0

Przykład 4. 100 ml żelu 5 mM po modyfikacji

395	6.7% roztwór metylocelulozy	50.0
	10 mM bromamina tauryny	50.0

400 Przykład 5. 100 ml 3.5 mM płynnego pudru

10 mM bromamina tauryny 35.0

Talk 22.0

Glicerol 38.0

405 Mentol 1.0

Woda destylowana ad 100.0

Przykład 6. 100 ml 5 mM płynnego pudru

410

10 mM bromamina tauryny 50.0

Talk 18.0

Glicerol 30.0

Mentol 1.0

415 Woda destylowana ad 100.0

PEŁNOMOCNIK

HUDY
Dr inż. LUDWIK HUDY
Rzecznik Patentowy
Nr rej. 3098

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja bakteriobójcza znamienna tym, że jej podstawowy składnik
5 jest roztworem bromaminy tauryny.
2. Kompozycja bakteriobójcza według zastrz. 1 znamienna tym, że jej
podstawowy składnik jest roztworem bromaminy tauryny w żelu
etylocelulozowym o pH 5 do pH 7.4.
10
3. Kompozycja bakteriobójcza według zastrz. 1 znamienna tym, że jej
podstawowy składnik jest roztworem bromaminy tauryny w kremie
cetomakrogolowym o pH 5 do pH 7.4.
- 15 4. Kompozycja bakteriobójcza według zastrz. 1 znamienna tym, że jej
podstawowy składnik jest roztworem bromaminy tauryny i wraz z pudrem
tworzy zawiesinę.
5. Kompozycja bakteriobójcza według zastrz. 4 znamienna tym, że składa
20 się z 14.0 do 50.0 % wagowych bromaminy tauryny, 10.0 do 24.0 % wagowych
talku, 14.0 do 40.0 % wagowych glicerolu, 1.0 do 4.0 % wagowych wody
destylowanej i 0.5 do 2.0% wagowych mentolu.
- 25 6. Bromamina tauryny, do użycia jako lek, znamienna tym, że jest
podstawowym składnikiem substancji leczniczej i stanowi 10% do 100%
wagowych substancji leczniczej.

7. Bromamina tauryny, do użycia jako lek, według zastrz. 6 znamiona tym, że jest roztworem w żelu etylocelulozowym o pH 5 do pH 7.4.
- 30
8. Bromamina tauryny, do użycia jako lek, według zastrz. 6 znamiona tym, że jest roztworem w kremie cetomakrogolowym o pH 5 do pH 7.4.
9. Bromamina tauryny, do użycia w leczeniu chorób skóry, znamiona tym, że jest podstawowym składnikiem substancji leczniczej i stanowi 10% do 100% wagowych substancji leczniczej.
- 35
10. Bromamina tauryny, do użycia w leczeniu chorób skóry, znamiona tym, że jest użyta w leczeniu trądziku.
- 40
11. Sposób otrzymywania bromaminy tauryny do użycia w kompozycji bakteriobójczej, znamionny tym, że roztwór NaOBr wkrapla się bardzo wolno mieszając do roztworu tauryny o stężeniu około 8 -12 razy wyższym od stężenia roztworu NaOBr, korzystnie 10 razy wyższym od stężenia roztworu NaOBr.
- 45
12. Kompozycja kosmetyczna znamiona tym, że zawiera w kosmetycznie dopuszczalnym podłożu bromaminę tauryny stanowiącą od 10% do 100% wagowych kompozycji.

PEŁNOMOCNIK
studo
Dr inż. LUDWIK HUDY
Rzecznik Patentowy
Nr rej. 3098



I, the undersigned, sworn translator of the English language for the District Court of the City of Cracow, Poland, hereby certify that the translation of the certificate of the application entitled **"Method for inhibiting pathogenic bacteria and fungi growth and microbicidal composition"** is true and complete translation of the original Polish document presented to me.

Reg. No. 15/2004

Cracow, May 31, 2004

Mgr Małgorzata Maria Walczak
Tłumacz Prисяięty z Języka Angielskiego
31-056 Kraków, ul. Józefa 44/8
tel. 21-34-50



Translation from the Polish language

THE PATENT OFFICE OF THE REPUBLIC OF POLAND

/in the middle of the page the national emblem of the Republic of Poland/

CERTIFICATE

Janusz Marcinkiewicz
Cracow, Poland
Andrzej Kasprowicz
Cracow, Poland
Ewa Remin
Cracow, Poland
Andrzej Remin
Cracow, Poland
Małgorzata Galos-Hudy
Czernichów, Poland

on April 7th, 2004 submitted to the Patent Office of the Republic of Poland an application for granting a patent for an invention called "**Method for inhibiting pathogenic bacteria and fungi growth and microbicidal composition**".

The description of the invention, patent claims and drawings, attached to this certificate, are true copies of the documents, which were submitted together with the application on April 7th, 2004.

The application was submitted under the following number: P-367052.

Warsaw, as of April 14th, 2004

on behalf of the President

/-/ illegible signature

Eng. Barbara Zabczyk

Head of Department



/in the left hand corner of the page the impressed golden round stamp-sticker with the national emblem of the Republic of Poland in the middle and the following inscription in the rim: /

THE PATENT OFFICE OF THE REPUBLIC OF POLAND

I

/on each subsequent page of the document the impressed stamp repeated with the national emblem of the Republic of Poland in the middle and the following inscription in the rim: /

THE PATENT OFFICE OF THE REPUBLIC OF POLAND

I

/in the right hand corner of the page the following number: /

367052

/the number in handwriting: /

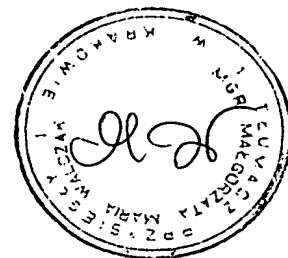
4

Method for inhibiting pathogenic bacteria and fungi growth and microbicidal composition

The subject of the invention is a method for inhibiting pathogenic bacteria and fungi growth and microbicidal composition to be used in the treatment of dermal conditions and diseases attributable, among other causative factors to *propioniumbacterium* types, particularly in the treatment of common acne (*acne vulgaris*).

This patent application is a supplement to the patent application under number P 359792 entitled "Method for inhibition of development of bacteria and pathogenic mycetes" filed within the Polish Patent Office on 22 April 2003. The method for the inhibition of the development of bacteria and pathogenic mycetes as presented in the original submission consists of treating dermal bacteria and pathogenic mycetes with an effective quantity of taurine bromamine [TaurBr]. Furthermore, a basic ingredient of the microbicidal composition, according to the invention, was the taurine bromamine [TaurBr] in concentrations of 10 – 100% content by weight.

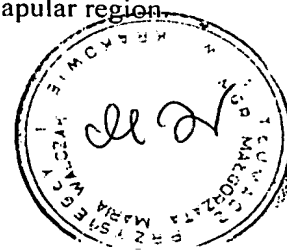
The common acne (*acne vulgaris*) is one of the most common dermal diseases of people in young ages. This disease is experienced during pubertal changes, this condition being associated with the development of hair-follicles, together with their associated sebaceous and excretory duct systems in association with the formation of keratinocytes. Despite progress in diagnostic techniques, acne remains a problem, not only for patients, but also for medical diagnosticians attempting to alleviate the problem. It is assumed that some 85% of the human population experiences these changes, associated with maturation, in a more or less intense form. More aggravated symptoms, at varying levels, occur within the 14-19 year-old age-range, and involve some 10% of the population. Either gender is susceptible to the condition,



but it is particularly prevalent in its severest form for pubertal males, due to genetic and hormonal changes.

The aetiology of acne is attributable to several causative origins, including; hormonal balances, genetics, immunology, and bacterial factors, having been mentioned. Juvenile acne occurs as a result of the increase of sebum production by the cutaneous glands under the influence of increased secretion of andro-genetic hormones during the pubertal phase. In the development of the condition four factors are of primary significance: increased secretion of sebum, excessive keratosis, blockage of the of the follicular/sebacial duct outlets and invasion and colonisation by anaerobic bacteria (in full Latinas name *Propionibacterium acnes*), which cause an inflammatory state in and around the sebaceous glands and result in the formation of so-called blackheads, inflamed papulae, surface cysts, atheromatous cysts and pustules. Androgens, as already mentioned, stimulate the secretion of sebum from the sebaceous glands. Sebum is a fatty substance that maintains a proper level of hydration of the skin and in keratin, the latter constituting the principal component of hair. The other main causative reason for the progenesis of acne is the obstruction of the ducts that exude sebum onto the surface of the skin. This leads to enlargement of the ducts of the sebaceous glands and the development firstly of closed *comedoes*, and then to their bursting. The blockages result in the excessive amounts of generated sebum being denied a route of egress. Blackheads or points with white heads appear. These changes are non-inflammatory in character. If the walls of the overfilled follicle burst, the secretions may be exuded into adjacent tissue-layers, resulting in the development of inflammatory acne. The infection invades the dermal tissue, cysts arise and these may burst at a later stage, leaving transient or even persistent tissue scarring. These changes may become subject to super-infection. The bacterium *P. acnes*, by introducing chemotactic factors, may engender a poly-nuclear leucocytic inflow to the sebaceous glands. As a result of the leucocyte-induced phagocytosis of the bacteria, hydrolytic enzymes are liberated, leading to the destruction of the walls of the sebaceous glands, allowing their content to invade the corium and leading to the development of an inflammatory condition. Papulo-pustuar eruptions may appear. In severe forms of acne, deep, purulent infiltrations and fistulae are generated, leading to permanent local scarring.

Within the blocked sebaceous glands the development of anaerobic bacteria takes place. These bacteria produce enzymes that decompose the sebum into free fatty acids, thereby intensifying the inflammatory state. The bacteria *P. acnes* and *P. granulosum* are mainly found in areas of the human body rich in sebaceous glands such as the head, the chest, the back, mainly in the intra-scapular region.



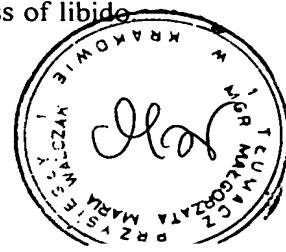
The abovementioned factors, associated with a raised concentration of micro-organisms, give rise to chronic inflammatory processes, involving to a variable degree the sebaceous hair follicles and the sebaceous glands with which they are associated. Stimulation of the sebaceous glands induces increased production of sebum whose lipid-rich secretions form an excellent medium in which bacteria may breed. A correlation has been observed between the severity of the degree of acne and the level of secretion of sebum. At the same time as the process is taking place, dyskeratinisation occurs – i.e. an abnormal proliferation of ductal keratinocytes and the avulsion of sebaceous gland cells, leading to the blockage of the ducts, thereby creating ideal conditions for the development of anaerobic bacterial growths.

In recognition of the variable aetiology of changes associated with acne, the potential increase in the intensity of such changes and the various sites in which the condition may occur, many, often diverse suggestions have been made as to how to treat this pathological state. The principal aim of treatment for common acne is to arrest the symptoms of seborrhoea by constricting the dermal pores, removal of the retained secretions, prevention of the occurrence of comedones, reducing the secretion of sebum, alleviating inflammatory states and decreasing hypersensitivity. Various therapeutic regimes have been applied, such as the administration of hormones (oestrogens and pro-oestrogens), courses of vitamins (B2, A, C, E, PP) or anti-biotics (tetracycline, erythromycin).

The traditional treatment uses local applicants containing de-hydrative compounds with the addition of salicylic acid, mentol, sulphur, resorcin, exposure to sunlight or UV light that is being no longer practised. The use of salicylic acid is also no longer recommended for the alleviation of the symptoms of acne due to its irritant effect in many cases. As an adjunct to treatment, large doses of vitamins are recommended, particularly those belonging to the vitamin B group.

4

Hormone-based medicines form one group; those which diminish the effect of androgens. Medicines containing progesterones are most frequently prescribed. They are most effective in cases of mild acne. Their action causes a diminution in concentrations of androgens and thereby reduces the rate of sebum secretion and the component creating conditions for inflammation. Spironolactone is another medicine with a similar effect and is popular for the treatment of acne. It has also been demonstrated that corticosteroids given generally, inhibit the secretion of androgens. Corticosteroids are mainly administered by direct injection to isolated deforming acne changes of a cystic or tubercular character to accelerate their rate of healing. Nevertheless, hormone-based medicines are not the most suitable and are only partially effective in cases exhibiting advanced dermal pathological conditions. Additionally, if large doses of Spironolactone mentioned earlier are administered, women may experience menstrual irregularities and men may suffer from gynaecomastia and loss of libido. Dizziness and a general feeling of fatigue may also be experienced.



Retinoids form another group of medicines, being derivatives of vitamin A. They are applied to slow the process of keratinisation, and are typically applied both locally and generally. Isotretynoine is characterised by its effect in stabilising abnormal *keratosis pilaris* and inhibiting the process of desquamation of epithelial cells by weakening their interconnections. Among generally-applied retinoids, isotretynoine has been proved to be the most effective. Its effectiveness relies on its reducing sebum secretion. Simultaneously it normalises the process of keratinisation in the hair follicles and although it has no direct antibacterial activity its effects, as noted above, result in a decrease in the changes occurring within hair follicles. Treatment with isotretynoine is particularly effective in severe cases of acne that exhibit inflamed cysts with the proviso that such treatment should be carefully monitored,

5

especially in the case of female patients as it is not recognised as being entirely safe. Such patients should be tested for pregnancy before treatment is commenced, lest foetal damage be caused. The treatment is contraindicated in cases of pregnancy (potential impairment of phoetus). It is also recommended that a course of treatment with isotretynoine should be accompanied by the use of oral contraceptives by women. The effect of retinoids is the normalisation of the desquamation process in the outlet ducts of the sebaceous glands, thereby facilitating the exudation of gland secretions and thereby resulting in a discernible reduction of comedogenesis. For this reason their main application is in cases of *acne comodonica*. Contra-indications are also exhibited by exsiccation, desquamation and reddening of the skin, these being frequent symptoms in patients taking isotretynoine. The use of such medicines may cause severe undesirable side-effects, particularly teratogenic reactions. Medicines from the retinoid group, as noted earlier, have no direct bacteriocidal activity. Such action is desirable in cases requiring treatment for dermal changes. In addition to the adverse effects of therapy using retinoids already noted, increases in levels of transaminases, bilirubin and hyper-three-glyceridermia may occur. For this reason patients in the risk-group i.e. with a family history of hyper-three-glyceridermia or diabetes are advised to be examined both before treatment and two months thereafter, not only a for general medical examination but with particular attention being paid to the liver and to lipid levels. Frequently-experienced side effects also include drying of the mucosae of the lips and the nasal cavity and conjunctivitis.

Yet another group of medicines used to treat pathological dermal states are antibiotics. They are normally used for local lavage or are applied locally as gels or ointments as well as being taken orally. The main activity of such medicines lies in their antibacterial effect, thereby diminishing the level of colonisation by bacteria of the external pores of the sebaceous glands. By decreasing the number of micro-organisms they directly decrease concentrations of free fatty acids, thereby lowering the levels of lipase and protease in the hair follicles.



Hence antibiotics are both antibacterial and anti-inflammatory in their action.

The main groups of antibiotics used for acne treatment are tetracyclins, macrolids, clindamycin and cotrimoticycol. The main disadvantage of antibiotics is that they cannot be used for extended periods, their application being restricted to 3 – 4 weeks. Moreover, the excessive, uncontrolled and indiscriminate use

6

of antibiotics and sulphonamides, as was the case in the 1970s and '80s has resulted in the fact that nowadays the use of many chemo-therapeutic agents, even superficially, has resulted in bacterial immunity to them, thereby rendering such agents ineffective. This concerns, among others, neomycin and tetracycline. There is also the possibility of adverse reactions.

Apart from antibiotics a number of locally-applied agents are used for the treatment of mild acne. These include benzyl peroxide, azelan acid, sulphur preparations and salicylic acid, the latter having been mentioned earlier.

A lesser-known therapy is to inject triamcynolon, a type of steroid directly into the cyst. This may have the temporary side-effect of darkening the skin around the site of the injection.

Adjunctive therapies are also used and these should be preceded by the patient being clearly and comprehensibly informed about them. Individualisation of patients' regimes, possibly administering several medicines simultaneously, in conjunction with hygiene/cosmetic procedures, and if necessary with cryotherapy, laser-therapy or treatment with liquid nitrogen may alleviate the symptoms of acne considerably.

Clinical tests have also been conducted using photodynamic therapy. The promising effects of photodynamic treatment observed after the external use of ALA solution and irradiation of the skin of patients with acne are primarily a decrease in the number of inflammatory changes, the photo-cytotoxic damage to the sebaceous glands the long-term suppression of sebum production and a considerable decrease in the numbers of bacteria.

In some cases vaccines and autovaccines are used. Irrespective of which is applied an immunological reaction occurs identically because all these preparations contain *P. acnes* strains with strong immunomodulating activity. The practice indicates, however, that in cases of patients treated with vaccines or autovaccines, there is a need to simultaneously administer preparations with

7

antibacterial and anti-inflammatory activity. Contra indicatively, it has been stated that treatment with vaccines containing antigens *P. acnes* and *P. granulosum* turned out to have little effect - only about 30% of patients experienced a limited improvement and the same proportion of patients showed a



worsening of their condition. Administering autovaccines, in the light of contemporary knowledge, would thus seem to be unjustified. Alike, the stimulus healing methods has been given up, for example auto chemical and autoserо therapeutics .

It is the aim of this invention to provide a bactericidal composition, that contains taurine bromamine being its essential component, that can be a solution in an ethyl-cellulose gel with pH of 5 – 7.4.

Preferably, taurine bromamine being its essential component, that can be a solution in a cetomakrogel emulsion with pH of 5 – 7.4.

Preferably, taurine bromamine being its essential component, together with a powder creates a suspension.

The microbicidal composition consisted of active substance, i.e. taurine bromamine at concentrations of 14.0 – 50.0 % content by weight, talc at concentration of 10.0 – 24.0 % content by weight, glycerol at concentration 14.0 – 40.0 % content by weight, distilled water at concentration of 1 – 4.0 content by weight and menthol at concentration of 0.5 – 2.0 content of weight.

It is another object of this invention, that taurine bromamine can be used as a medicine in treatment of pathological dermal conditions, especially in treatment of acne.

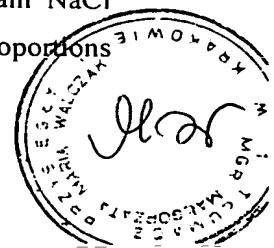
It is another object of this invention, to obtain taurine bromamine a solution of NaOBr was introduced by drops (whilst stirring very slowly) to the taurine solution with a concentration of ca. 8-12 times higher than the concentration of the NaOBr solution. Preferably, while producing taurine bromamine, the concentration of the taurine solution was around 10 times higher than the concentration of the NaOBr solution.

It is another object of this invention, that in the cosmetic composition, with a cosmetical background, contains taurine bromamine being an essential component of the composition at concentration of 10-100% by weight.

During the studies, it has been found, unexpectedly, that taurine bromamine, which shows much stronger bactericidal activity than taurine chloramine, produces a bactericidal effect on bacteria of *Propionibacterium* types, which are one of etiologiсal factors of common acne (*Acne vulgaris*).

Moreover, it turned out that taurine bromamine does not destroy the whole bacterial flora but acts selectively in certain conditions.

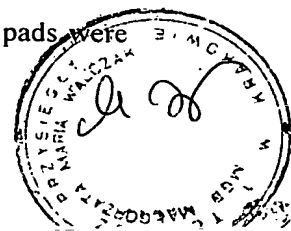
Different methods for producing taurine bromamine are known in present biochemical technology. In order to evaluate its bactericidal properties according to the invention, taurine bromamine was prepared on the day of the clinical test. In this order the solution of 180 mM NaOCl (Aldrich, Germany) was mixed in a phosphate buffer (POCH, Gliwice, Poland) to obtain NaCl solution with a concentration of 60 mM. The 60 mM solution of NaCl was mixed in equal proportions



with a 100 mM solution of NaBr (POCH, Gliwice, Poland). NaOBr obtained in this way was diluted in a phosphate buffer (POCH, Gliwice, Poland) with a final concentration of NaOBr not exceeding 10 mM. To obtain taurine bromamine a solution of NaOBr was introduced by drops (whilst stirring very slowly) to the taurine solution (*Sigma*, St. Louis, MO) with a concentration of ca. 100 mM. The concentration of the taurine solution was 8-12 times higher than the concentration of the NaOBr solution, although taurine may be used in higher concentrations - up to 100 times greater. Preferably, while producing taurine bromamine, the concentration of the taurine solution was around 10 times higher than the concentration of the NaOBr solution. This resulted in the taurine bromamine solution having a molar concentration not exceeding 10 mM. The molar concentration of the taurine bromamine produced was assessed by measuring the extinction at a wave-length $\lambda_{\text{max}} = 286 \text{ nm}$, where the molarity of taurine bromamine equals value of extinction in peak 430^{-1} .

In order to conduct further tests to ascertain the antibacterial activity of the formulation containing taurine bromamine and prepared by the method described above, the imprinting method was chosen with use of *Rodac* plates with an area of 25 cm^2 . For the purposes of study a *Scheadler Agar Base* medium produced by the firm Dico, catalogue number 212189, was used with addition of 5% ram blood. The medium was poured steadily onto the *Rodac* plates in aseptic conditions until a convex meniscus appeared. Before being applied, the medium was kept in enclosed conditions within a fridge at a temperature of ca. $+4^\circ \text{C}$ and was used in a time not exceeding 7 days from the date of its preparation. For the purpose of the studies several volunteers were selected - women aged between 23 and 27, who exhibited no discernable clinical pathological changes

of the skin surface and who were not taking preparations with antibacterial activity during the studies, neither on the skin surface nor internally. Tests for the microbicidal activity of taurine bromamine were conducted by performing 5 imprints of the dorsal skin on time at each of the patients examined. The skin area, on which the tests were to be performed, was determined in advance and marked with the numbers 1 - 5. After having marked the place where the test was to be performed, sterile gauze pads of area 4 cm^2 saturated with different substances were applied to the skin. At the site marked 1 - a gauze pad saturated with 0.9% inj. solution of NaCl, which was a control substance without antibacterial activity was applied to the skin. At site 2 - a gauze pad saturated with a 4 - 7 mM solution of taurine bromamine in a buffer with pH 5 - pH 6.4 was applied to the skin. At site 3 - a gauze pad saturated with a 4 - 7 mM solution of taurine bromamine in a buffer with pH 6.4 - pH 7.4 was applied to the skin. At site 4 - a gauze pad saturated with a 1% solution of salicylic acid in a buffer with pH 5 and at the site marked 5 - a gauze pad saturated with a 1% solution of salicylic acid in a buffer with pH 7 was applied to the skin. 1% solutions of salicylic acid in buffers with pH 5 and pH 7 are substances which are used routinely in the treatment of acne. At all sites gauze pads were



fixed firmly to the skin surface for 30 minutes and then were removed off. 5 minutes after their removal, as the skin was already dry, the *Rodac* type plates were pressed down so that the site treated with the substance tested was imprinted centrally on the plate. Next the plates were placed in anaerobic conditions using the Gas Pack system produced by the firm Biomerieux and incubated for 5 days at a temperature of 37°C. After completing the incubation the bacteria growths on the imprinting plates from sites 2, 3, 4, 5 after treatment with the substance tested on each patient were compared with the control plate applied at site 1. Wherever possible, all the cultivated colonies of relatively aerobic and anaerobic bacteria were counted, to provide a figure for the concentration per cm² of the skin. The studies were repeated four times on the same patients at one-week intervals, which produced similar results. On the basis of the results obtained a considerable diminution in the number of bacteria on the skin area treated with the 4 – 7 mM solution of taurine bromamine in a buffer with pH 5 – pH 7 was recorded for all the patients examined,

10

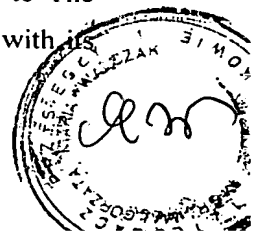
and the biggest decrease in bacterial concentration, from the uncountable level of ca 10⁴ CFU/ cm² to a level of 10¹ – 10² CFU/cm² was observed on the skin areas treated with a 5 mM solution of taurine bromamine in a buffer with pH 7.

Further studies of the microbicidal activity of taurine bromamine were conducted using a gel, a cream and a powder. In these tests, applications with a semisolid consistency and plastic features were made, called hereinafter, pharmaceutical or cosmetic preparations or compositions, particularly a taurine bromamine solution in an ethyl-cellulose gel with pH 5 – pH 7, a cetomacrogol cream with pH 5 – pH 7 and a powder suspension in a taurine bromamine solution.

The powder suspension in taurine bromamine solution was prepared on a base of liquid powder changing the proportions of the components by weight. The suspension consisted of, by weight: 14.0 – 60.0 % of 10 mM Taurine bromamine solution, 10.0 – 24.0 % of talc, 14.0 – 40.0 % of glycerol, 5.0 – 30.0 % of distilled water and 0.5 – 2.0 % of menthol. The constituents of the suspension were stirred thoroughly until an homogenous dispersion of the solid phase was obtained.

The taurine bromamine solution in an ethyl-cellulose gel was prepared on a base of methyl-cellulose solution (Methocel 1500 cP) on a sterile phosphate buffer with pH 7.4 by pouring methyl cellulose to approx. one third of the volume of the prepared buffer solution at a temperature of ca. 90°C and mixed so that the powder became completely moistened. The substance prepared in this way was cooled. The remainder of the buffer solution together with the taurine bromamine solution was added, similarly cooled, and was mixed thoroughly then left in a fridge to become clarified.

To prepare taurine bromamine solution in a cream form, (in brief – the preparation on a cream base), a cetomacrogol cream (Cetomacrogol Cream, Sorbolone Cream) was used according to The Extra Pharmacopoeia, Ed. 29. It was modified by introducing a phosphate buffer at pH 7.4 (with it



composition KH_2PO_4 i $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) in different amounts to replace distilled water. Next, the chloro-cresol in this cream was replaced with

11

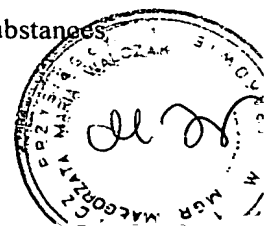
a mixture of preservative agents in different amounts. The mixture contained 1.0 – 3.0 g of benzyl alcohol, 120 – 200 mg of methyl-hydroxybenzoate or sodium hydroxybenzoates and 60 – 100 mg of propyl-hydroxybenzoate (propyl hydroxybenzoates). The production of the cream-based preparation began with melting the components of a cetomacrogol cream oil phase (emulsifying wax, liquid paraffin, white petroleum) in a water bath. Then the water phase (a sterile phosphate solution, a taurine bromamine solution, preserving agents) was emulsified in warmth at a temperature of ca. 60°C into the oil phase and stirred until the mixture set.

The preparations based on a cream and gel base and the powder suspension were applied to the skin of the subjects at the places marked with numbers 1 – 5. Each of the preparations was applied to an area of ca. 4 cm² of every patient tested in the following way: at site “1” - a 0.4 – 0.8 mM taurine bromamine solution in a ethyl cellulose gel with pH 5 – pH 7 was applied to the skin, at site “2” – a suspension of 3.0 – 4.5 mM taurine bromamine in an ethyl-cellulose gel with pH 5 – pH 7, at site “3” – the preparation of 3.0 – 4.5 mM taurine bromamine solution in a cetomacrogol cream with pH 5 – pH 7 and at site “4” – the powder suspension of 3.0 – 5.0 mM taurine bromamine was applied. The preparations were left on the skin area for 30 minutes and then the plates were pressed down so that the site exposed to the activity of the various substances was imprinted centrally on the plate. Later, as in case of the taurine bromamine solutions, the plates were placed in anaerobic conditions using the Gas Pack system produced by Firm Biomerieux and incubated for 5 days at a temperature of 37°C. After completing the incubation, the bacterial growth on the imprinting plates, from the sites marked by 1 - 5, which had been treated with the substance tested, were compared. Wherever it was possible, all cultivated colonies of relatively aerobic bacteria and anaerobic bacteria were counted, giving their occurrence per 1 cm² of the skin. The tests were conducted four times on the same people at one-week intervals, which produced similar results. On the basis of the results the most significant diminution in bacterial activity was observed in all patients

12

on the skin areas treated with the suspension of above 3.5 mM taurine bromamine in the cetomacrogol cream at pH 7.

The taurine bromamine solutions in a cream and in a gel and powder suspensions in the taurine bromamine solutions, which may serve as examples of cosmetic compositions and pharmaceutical compositions, are given below. Proportions of the components of the substances



mentioned below may be changed in response to the sensitivity of the skin. However, in case of a normal skin it is recommended that the molarity of these substances should not exceed 5 mM taurine bromamine, because above this level all the bacterial flora is destroyed.

Example 1. 100 ml of 3.5 mM modified cream

Cetomakrogel emulsion	about	15.0
Liquid paraffin	about	10.0
Vaseline (or paraffin jelly)	about	10.0
Benzyl alcohol		1.5
Sodium hydroxybenzoates		0.15
Propyl hydroxybenzoates		0.08
Propylene glycol		5.0
10 mM Taurine bromamine		35.0
Water	ad	100.0

Example 2. 100 ml of 5.0 mM modified cream

Cetomakrogel emulsion	about	15.0
Liquid paraffin	about	10.0
Vaseline (or paraffin jelly)	about	10.0
Benzyl alcohol		1.5
Sodium hydroxybenzoates		0.15
Propyl hydroxybenzoates		0.08
Propylglucose		5.0
10 mM Taurine bromamine		50.0
Water	ad	100.0

Example 3. 100 ml of 3.5 mM modified gel

5% methylcellulose solution	65.0
10 mM Taurine bromamine	35.0

Example 4. 100 ml of 5.0 mM modified gel

6.7% methylcellulose solution	50.0
10 mM Taurine bromamine	50.0

Example 5. 100 ml of 3.5 mM fluid powder

10 mM Taurine bromamine	35.0
Talc	22.0
Glycerol	38.0
Menthol	1.0
Distilled water	ad 100.0



Example 6. 100 ml of 5.0 mM fluid powder

10 mM Taurine bromamine		50.0
Talc		19.0
Glycerol		29.0
Menthol		1.0
Distilled water	ad	100.0

/oblong stamp with the following contents:/

PLENIPOTENTIARY
Eng. Ludwik Hudy, PhD
Patent Attorney
Reg. No 3098

/in the right hand corner of the page the following number:/

367052

/the number in handwriting:/

5

Patent claims

1. A microbicidal composition wherein the essential component of the composition is the taurine bromamine solution.
2. The microbicidal composition according to claim 3 wherein the taurine bromamine is a solution in an ethyl-cellulose gel with 5 – 7.4.
3. The microbicidal composition according to claim 1 wherein the taurine bromamine is a solution in a cetomakrogel cream with pH of 5 – 7.4.
4. The microbicidal composition according to claim 1 wherein the taurine bromamine is its essential component that with the powder creates a suspension.
5. The microbicidal composition according to claim 4 wherein the composition contains further the taurine bromamine in amount of 14.0 – 50.0 % by weight, talk in amount of 10.0 – 24.0 % by weight, glycerol in amount of 14.0 – 40.0 % by weight, distilled water in amount of 5.0 – 4.0 % by weight and menthol in amount of 0.5 – 2.0 % by weight.
6. The taurine bromamine, used as a medicine, being the essential component of the composition at concentration of 10-100% by weight.
7. The taurine bromamine, used as a medicine, according to claim 6 wherein the taurine bromamine is a solution in an ethyl-cellulose gel with pH of 5 – 7.4.



8. The taurine bromamine, used as a medicine, according to claim 6 wherein the taurine bromamine is a solution in cetomakrogel emulsion with pH 5 – 7.4.
9. The taurine bromamine, used as a medicine in treatment of pathological dermal conditions, wherein the taurine bromamine is the essential component of the pharmaceutical composition cosmetic composition.
10. The taurine bromamine, used as a medicine in treatment of pathological dermal conditions, wherein the taurine bromamine is used in treatment of acne.
11. A method for obtaining the taurine bromamine, used in the microbicidal composition wherein a solution of NaOBr is introduced by drops (whilst stirring very slowly) to the taurine solution with a concentration of ca. 8-12 times higher than the concentration of the NaOBr solution, preferably 10 times higher than the concentration of the NaOBr solution.
12. A cosmetic composition wherein it contains the taurine bromamine at concentration of 10-100% by weight.

/oblong stamp with the following contents:/

PLENIPOTENTIARY
Eng. Ludwik Hudy, PhD
Patent Attorney
Reg. No 3098

